

ARTIGO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01387>

Avaliação da técnica de detecção por fluorescência como alternativa para contagem de bactérias heterotróficas em água para hemodiálise

Evaluation of fluorescence detection technique as an alternative for heterotrophic bacteria count in hemodialysis water

RESUMO

Ellen Gameiro Hilinski^{1,II,*} Adriana Bugno^I Fernando Pontes de Lima e Silva^I Adriana Aparecida Buzzo Almodovar^I Terezinha de Jesus Andreoli Pinto^{II} 

Introdução: A qualidade microbiológica da água tratada para hemodiálise está diretamente relacionada à ocorrência de infecções e de reações pirogênicas nos pacientes. **Objetivo:** Determinar o tempo de incubação mínimo e avaliar o desempenho do método microbiológico alternativo para a contagem de bactérias heterotróficas em água de hemodiálise por meio da técnica de detecção microbiana por fluorescência. **Método:** As análises foram conduzidas com níveis de concentração entre $2,5 \times 10^{-1}$ e $1,0 \times 10^2$ UFC/placa para *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os testes foram realizados simultaneamente pelos métodos alternativo e tradicional, utilizando o meio de cultura R2A e temperatura de incubação de $24,0^\circ\text{C} \pm 4,0^\circ\text{C}$. Os tempos de incubação empregados foram os de 40 h e 120 h, respectivamente. Quatorze amostras de água para hemodiálise foram analisadas para avaliação da equivalência entre os métodos avaliados. **Resultados:** Os resultados demonstraram que o método alternativo permite a quantificação de bactérias heterotróficas após 40 h de incubação, com precisão, exatidão, especificidade e linearidade para a faixa de 5 a 100 UFC/placa. O limite de detecção do método alternativo é 1 UFC/placa. **Conclusões:** O método alternativo possui resultados equivalentes ao método tradicional, uma vez que o intervalo de confiança do método alternativo obtido esteve compreendido inteiramente dentro da faixa de equivalência. Portanto, a técnica de detecção microbiana por fluorescência mostrou ser uma opção viável para a implementação de um método microbiológico rápido para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise.

PALAVRAS-CHAVE: Hemodiálise; Água Tratada; Bactérias Heterotróficas; Fluorescência

ABSTRACT

Introduction: The microbiological quality of hemodialysis treated water is directly related to the occurrence of infections and pyrogenic reactions in patients. **Objective:** Determine the minimum incubation time and evaluate the alternative microbiological method performance for heterotrophic bacteria count in hemodialysis water through the fluorescence microbial detection technique. **Method:** The analyses were conducted by concentration levels of $2,5 \times 10^{-1}$ to $1,0 \times 10^2$ CFU/plate for *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The tests were performed simultaneously by the alternative and the traditional methods, using culture medium R2A and incubation temperature of $24.0^\circ\text{C} \pm 4.0^\circ\text{C}$. The incubation times were 40 h and 120 h, respectively. Fourteen hemodialysis water samples were analyzed to assess the equivalence between the methods evaluated. **Results:** The results demonstrated that the alternative method allows quantification of heterotrophic bacteria after 40 h of incubation, with accuracy, precision, specificity and linearity for the range of 5 to 100 CFU/plate. The detection limit of the alternative method is 1 CFU/plate. **Conclusions:**

^I Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

^{II} Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

* E-mail: ellen.hilinski@ial.sp.gov.br

Recebido: 30 jul 2019

Aprovado: 20 abr 2020



It was possible to conclude that the alternative method has equivalent results to the traditional method, since the confidence interval of the alternative method was entirely within the equivalence range. Therefore, the microbial detection technique by fluorescence showed a viable option for the implementation of a rapid microbiological method for the heterotrophic bacteria count in samples of treated water for hemodialysis.

KEYWORDS: Hemodialysis; Treated Water; Heterotrophic Bacteria; Fluorescence

INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica da água tratada para hemodiálise está diretamente relacionada à ocorrência de infecções e de reações pirogênicas nos pacientes. Modificações na integridade das membranas dos dialisadores bem como manutenção inadequada do sistema de tratamento e distribuição da água podem ser destacadas como as mais prevalentes causas de contaminação, principalmente por bactérias Gram negativas, potenciais formadoras de biofilme, este que, uma vez estabelecido, facilita a persistência microbiana e atua como fonte permanente de bactérias e endotoxinas, aumentando o risco aos quais os pacientes estão expostos^{1,2,3}.

Devido à criticidade que a qualidade da água para hemodiálise apresenta, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada nº 11, de 13 de março de 2014, o padrão mínimo de qualidade microbiológico, não sendo aceitos valores de contagens de bactérias heterotróficas superiores a 100 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL)⁴.

A maioria dos contaminantes microbianos em sistemas de água encontra-se principalmente sob a forma de biofilmes em superfície, com apenas uma porcentagem reduzida do microbioma suspenso na água sob a forma planctônica⁵.

Embora a melhor opção esteja relacionada ao monitoramento direto do desenvolvimento de biofilmes em superfícies, as tecnologias atuais para avaliações de superfície em um sistema de água tornam esta tarefa impraticável em uma clínica de diálise. Portanto, uma abordagem indireta deve ser utilizada: a avaliação para a detecção e enumeração de micro-organismos planctônicos liberados dos biofilmes por meio da coleta de amostras de saídas do sistema de água. Ao realizar a enumeração dos micro-organismos presentes nestas amostras pode-se determinar o estado geral de controle sobre o desenvolvimento do biofilme no sistema de tratamento da água⁵.

O não atendimento aos critérios de qualidade microbiológicos para a água de hemodiálise definidos pela legislação⁴ podem resultar na ocorrência de reações pirogênicas, devido à presença de endotoxinas, bem como na aquisição de infecções, esta última a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes sob hemodiálise⁶.

A legislação estabelece que o serviço de diálise monitore a qualidade microbiológica da água resultante do sistema de tratamento e distribuição de água para hemodiálise mensalmente em amostras coletadas no ponto de retorno da alça de

distribuição (*loop*) e em um dos pontos na sala de processamento (reuso)⁴.

Os métodos analíticos de referência atualmente disponíveis para a enumeração de micro-organismos são amplamente acessíveis, reprodutíveis e reconhecidos por agências regulatórias como Padrão Ouro⁷. Por estarem fundamentados em métodos clássicos de cultivo, dependem de condições que permitam o crescimento e a replicação microbiana até a detecção por exame visual, que pode demandar entre 18 h a 14 dias^{5,7}.

Compêndios oficiais, como o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*⁸, recomendam o uso dos métodos de semeadura em profundidade, semeadura em superfície e de filtração por membrana para enumeração de bactérias heterotróficas e fungos em água tratada para hemodiálise. Entretanto, como em qualquer método microbiológico, a variabilidade no crescimento celular é afetada: pelo tipo de meio de cultura utilizado, pelos métodos empregados para a recuperação, pela condição do micro-organismo durante o período de teste e pela temperatura de incubação^{5,9,10}.

Ao longo dos anos, o método *pour plate* tem sido o mais comumente utilizado para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água devido ao baixo custo e à facilidade de execução. Entretanto, a adição do ágar fundido a aproximadamente 45°C-48°C pode aumentar o *stress* sobre os micro-organismos, que já se encontram fisiologicamente estressados, resultando na diminuição significativa da recuperação de bactérias em comparação com as recuperações obtidas pelos métodos *spread plate* e filtração por membrana^{8,10,11}.

A dificuldade de adaptação dos micro-organismos a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes e a incapacidade de algumas espécies em se dividir e formar colônias constituem desafios para o cultivo dos micro-organismos.

Até o final da década de 1980, os meios de cultura com alto teor nutricional, como o ágar caseína de soja e o ágar padrão para contagem, eram recomendados para a enumeração de bactérias heterotróficas em amostras de água potável e tratada¹². Entretanto, após a publicação do estudo realizado por Reasoner e Geldreich¹¹, o meio de cultura Reasoner's 2 Ágar (R2A) foi apresentado como substituto aos meios de cultura com alto teor nutricional, pois permite maior recuperação bacteriana, principalmente se incubado à temperatura de 20°C-25°C por 5 a 7 dias^{5,8,9,10,11,12,13}.

Os meios pouco nutritivos, como o R2A, quando incubados preferencialmente em baixas temperaturas de incubação,



permitem a obtenção de contagens de aeróbicos cinco a dez vezes maiores. Este fato está relacionado à sobrevivência de bactérias sob alterações físicas e à queda metabólica em ambientes oligotróficos^{10,14}.

Considerando que a qualidade microbiológica da água é um parâmetro crítico do sistema que deve ser monitorado, é difícil reagir aos resultados quando a qualidade não pode ser avaliada em tempo real. Desta forma, o tempo necessário para a obtenção dos resultados constitui a principal desvantagem para os métodos baseados em cultivo¹⁴.

O tempo excessivamente longo para obtenção dos resultados analíticos pelos métodos tradicionais publicados em compêndios oficiais tem conduzido à busca de métodos microbiológicos alternativos que permitam a liberação de resultados em menor tempo e que, desta forma, auxiliem na antecipação de investigações sobre possíveis falhas no tratamento da água^{7,15,16,17}. Dentre eles, a técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência para enumeração de bactérias heterotróficas caracteriza uma opção atrativa devido à possibilidade de redução do tempo analítico, à facilidade de execução do ensaio e à precisão dos resultados. Porém, a aplicação de métodos alternativos depende de demonstração da equivalência frente aos métodos oficiais para justificar a implementação da tecnologia no monitoramento da qualidade microbiológica de água tratada para hemodiálise.

As novas tecnologias, também denominadas de métodos microbiológicos rápidos, permitem a detecção, identificação e quantificação microbiana em menor tempo quando comparadas aos métodos tradicionais. Além de diminuir o tempo de liberação de resultados e de antecipar a tomada de decisões relacionadas às investigações, estas tecnologias podem oferecer automatização dos ensaios, maior precisão, reprodutibilidade e sensibilidade¹⁸.

Entretanto, as dificuldades em avaliar, validar e obter a aprovação dos órgãos regulatórios para utilização destas tecnologias nos ensaios microbiológicos têm retardado a implementação de novas formas de trabalho, pois a demonstração da equivalência frente a métodos oficiais necessita ser comprovada^{5,17}.

Compêndios oficiais, como a Farmacopeia Brasileira¹⁹, a *United States Pharmacopeia*⁵ e a *European Pharmacopoeia*²⁰, influenciados pela publicação do *PDA Technical Report* n. 33, *Evaluation, Validation and Implementation of new microbiological testing methods*¹⁷, recentemente publicaram capítulos específicos para auxiliar a comunidade científica e a indústria farmacêutica na validação de métodos microbiológicos alternativos.

Metodologias que utilizam o princípio de coloração por fluorescência têm sido amplamente empregadas para monitorar a contaminação microbiana nas últimas décadas, principalmente na indústria de alimentos, devido à possibilidade de redução do tempo analítico e à precisão dos resultados²¹.

O potencial para detecção microbiana pelo uso de fluorescência permitiu o desenvolvimento de tecnologias analíticas, entre as quais o sistema Milliflex® Quantum, uma tecnologia baseada

em crescimento que combina a filtração de amostras por membrana com a coloração fluorescente de micro-organismos viáveis, sendo composto por uma bomba de filtração, leitor de fluorescência, câmara e fluorocromos.

Após a etapa de filtração da amostra com o auxílio de uma bomba, os micro-organismos são retidos na membrana e corados por um marcador de viabilidade de fluorescência. O princípio da técnica é baseado em uma reação enzimática na qual o éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína, substrato fluorogênico utilizado, é um marcador de viabilidade não fluorescente que é clivado por enzimas intracelulares não específicas resultando na liberação do composto éster de succinimídil de carboxifluoresceína (CFSE), um produto fluorescente quando excitado ao comprimento de onda de 488 nm²¹. Por apresentar baixa permeabilidade à membrana celular, o CFSE é acumulado no interior das células e, portanto, atua como indicativo de atividade do metabolismo microbiano e da integridade da membrana, permitindo detectar microcolônias após exposição ao comprimento de onda de excitação do corante de fluorescência através do leitor Milliflex® Quantum^{21,22,23}.

Como apenas células viáveis (incluindo endósporos, formas vegetativas, bactérias anaeróbias e fungos) são capazes de reter e acumular o CFSE, serão estas as células que serão identificadas pela emissão de fluorescência.

Por meio desta técnica, as microcolônias fluorescentes podem ser contadas pelo analista diretamente por meio do leitor do equipamento Milliflex® Quantum ou através de uma imagem exibida em uma tela de computador por meio de uma câmera acoplada ao leitor do equipamento e a utilização de um *software*. Por uso desse *software* é possível clicar nas colônias e marcá-las como contadas, o que diminui as chances de erros humanos.

Portanto, após menor período de incubação, é possível observar a detecção de microcolônias fluorescentes e realizar a liberação de resultados de enumeração de micro-organismos sem a necessidade de aguardar a contagem visual das UFC^{21,22}. Esse método é caracterizado por ser não destrutivo e permitir posterior identificação por meio de tecnologias de caracterização microbiana, caso seja necessário^{21,22,23}.

As vantagens da utilização deste sistema para a avaliação da qualidade microbiológica da água tratada para hemodiálise estão relacionadas à facilidade de execução da técnica e à obtenção de resultados de detecção de micro-organismos viáveis e cultiváveis em menor tempo, quando comparado aos métodos oficiais, permitindo a antecipação de investigações sobre possíveis falhas no tratamento da água. Adicionalmente, oferece a vantagem de se aproximar dos métodos tradicionalmente utilizados, o que facilita a condução dos ensaios de validação frente aos requisitos compendiais, além de investimento inferior para a aquisição de insumos e equipamento quando comparado a outras tecnologias disponíveis.

O estudo teve por objetivo determinar o tempo mínimo de incubação e avaliar o desempenho do método microbiológico



alternativo para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise por meio da técnica de detecção microbiana por fluorescência.

MÉTODO

O estudo foi dividido em três etapas: determinação do tempo mínimo de incubação (etapa 1), avaliação de desempenho do método alternativo (etapa 2) e equivalência (etapa 3).

Em todas as etapas, as contagens obtidas pela técnica de detecção por fluorescência por meio do sistema Milliflex® Quantum (método alternativo), bem como as contagens obtidas após a reincubação das placas, também pelo método alternativo, foram comparadas às obtidas pelo método tradicional⁸. Em seguida, foram calculadas as taxas de recuperação de contagem fluorescente e de recuperação de viabilidade, utilizando o valor do log das UFC obtidas nas contagens.

Metodologia tradicional

Foi empregada a técnica de plaqueamento em profundidade, utilizando R2A (Merck, Alemanha) como meio de cultura. A contagem visual das UFC presentes nas placas foi efetuada após 120 h de incubação em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0°C + 4,0°C⁸ com o auxílio do contador de colônias.

Metodologia alternativa (Milliflex® Quantum)

Foi empregada a técnica de filtração por membrana de ésteres mistos de celulose (Millipore, Alemanha) com tamanho de poro de 0,45 µm e diâmetro de 47 mm, por meio do sistema Milliflex® Quantum (Millipore, Alemanha). Foram utilizadas placas pré-ensadas com R2A (Millipore, Alemanha) como meio de cultura para incubação a 24,0°C + 4,0°C pelos períodos descritos em cada etapa do trabalho.

Após cada período, 2 mL do reagente de fluorescência (Millipore, Alemanha) foram adicionados à membrana, seguida pela incubação por 30 min na temperatura de 32,5°C ± 2,5°C para difusão do reagente. Os resultados foram registrados sob a denominação de contagem fluorescente após a contagem das microcolônias fluorescentes utilizando o leitor Milliflex® Quantum (Millipore, Alemanha).

Após a contagem, as placas foram reincubadas em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0°C + 4,0°C até o tempo total de incubação de 120 h, quando foi realizada a contagem visual das UFC com o auxílio do contador de colônias. Estes resultados foram registrados sob a denominação contagem de viabilidade.

Etapa 1 - Determinação do tempo mínimo de incubação pelo método alternativo por meio do sistema Milliflex® Quantum

Inóculos individuais adquiridos com concentração de 50 UFC/100 µL de *Escherichia coli* NCTC 12923 (Biomerieux, Austrália), *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 (Biomerieux, Austrália) e *Burkholderia cepacia* NCTC 10743 (Biomerieux, Austrália)

foram utilizados, de modo a obter 50 UFC por placa pelo método tradicional. Para o método alternativo foi realizada a filtração de 100 mL de água purificada estéril contaminada artificialmente e individualmente com os mesmos inóculos microbianos, de modo a obter 50 UFC por membrana.

Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Microbiologics, Estados Unidos da América), o preparo da suspensão microbiana estoque foi realizado em caldo caseína de soja (incubação a 32,5°C ± 2,5°C por 24 h), seguido pela diluição seriada da suspensão de modo a obter a concentração final de 50 UFC/mL, utilizando solução cloreto de sódio 0,9% (p/v) como diluente.

Foram avaliados os períodos de incubação de 24, 36, 40, 48 e 120 h para o método alternativo, sendo os ensaios realizados em quadruplicata para cada tempo de incubação proposto. Em paralelo, foram executados os ensaios em quadruplicata através do método tradicional.

Etapa 2 - Avaliação de desempenho do método alternativo

O método de enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para hemodiálise pela técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência foi desafiado frente aos parâmetros estabelecidos para testes quantitativos descritos nos principais compêndios oficiais: exatidão, precisão, precisão intermediária, linearidade, robustez, limite de detecção e de quantificação^{5,19,20}.

Foram preparadas sete suspensões microbianas individuais para cada um dos micro-organismos utilizados no estudo: *E. coli* NCTC 12923 (Biomerieux, Austrália), *S. aureus* NCTC 10788 (Biomerieux, Austrália), *B. cepacia* NCTC 10743 (Biomerieux, Austrália) e *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Microbiologics, Estados Unidos da América). A partir de cada uma destas suspensões, foram realizadas diluições seriadas de modo a obter oito concentrações distintas compreendidas entre 2,5 x 10⁻¹ e 1,0 x 10² UFC/mL, utilizando solução cloreto de sódio 0,9% (p/v) como diluente.

Para o método alternativo, foi realizada a filtração de 100 mL de água purificada estéril contaminada artificialmente e individualmente com os inóculos microbianos enquanto para o método tradicional os inóculos foram transferidos diretamente para o centro das placas de petri.

Os ensaios para avaliação dos parâmetros precisão, exatidão, linearidade, limites de detecção e quantificação foram realizados em duplicata para cada suspensão microbiana, simultaneamente, por meio do método tradicional e do método alternativo, juntamente com uma réplica utilizando água purificada estéril como controle negativo do ensaio¹⁷.

Para os estudos de precisão intermediária foram utilizados inóculos na faixa de 10 a 100 UFC/placa para a realização de ensaios em triplicata pelos analistas A e B em dias distintos. Foram ensaiadas três réplicas, por nível de concentração para cada micro-organismo, por analista. Os ensaios foram conduzidos em duplicata para cada réplica, concomitantemente para o método alternativo e tradicional.



O período de incubação empregado para o método alternativo foi de 40 h a temperatura de 24,0°C + 4,0°C.

Etapa 3 - Equivalência

Para a execução dos ensaios da etapa de Equivalência foram utilizadas 24 amostras de água tratada para hemodiálise coletadas em frascos estéreis pelos grupos de Vigilância Sanitária Municipais e Estaduais do Estado de São Paulo em serviços de diálise localizados em municípios do estado de São Paulo, durante os meses de abril e maio de 2019, contemplando 12,0% dos serviços de diálise em funcionamento no estado. O ponto de água tratada localizado na sala de processamento (reuso) foi o ponto de coleta definido para o estudo. Na ausência de sala de processamento na unidade, foi utilizado o ponto de retorno da alça de distribuição (*loop*).

A coleta e o transporte das amostras de água tratada para hemodiálise foram realizados de acordo com as recomendações da *American Public Health Association*⁸. O material para análise foi transportado em caixas térmicas com capacidade máxima de 26 L (Easypatch®, São Paulo) imediatamente após a coleta, sob temperatura inferior a 10°C, e processado no mesmo dia do recebimento²⁴.

Os ensaios foram executados simultaneamente por meio dos métodos tradicional e alternativo utilizando os tempos de incubação de 120 h e 40 h, respectivamente. A tomada de ensaio das amostras contemplou os volumes de 1 mL (10^0) e 100 µL (10^{-1}), em duplicata.

Para a demonstração da não inferioridade do método alternativo em relação ao método tradicional, foi aplicado o teste de equivalência (TOST) para amostras pareadas com o logaritmo das contagens obtidas nos ensaios realizados na etapa 2, bem como para o logaritmo das contagens obtidas nos ensaios realizados com as amostras coletadas de água tratada para hemodiálise.

A hipótese de que os métodos alternativo e tradicional são equivalentes foi testada com os dados obtidos na etapa 2 para os quatro micro-organismos utilizados no estudo, bem como com os dados obtidos nos ensaios das amostras coletadas de água tratada para hemodiálise, utilizando um limite inferior de 70,0% e um limite superior de 130,0%, conforme preconizado pelos compêndios internacionais^{5,17}.

Análise estatística

Para avaliação dos resultados, todas as análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Minitab® v.18 (Minitab Inc., EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa 1- Determinação do tempo mínimo de incubação por meio do sistema Milliflex® Quantum

A etapa 1 buscou avaliar como a variação no tempo de incubação pode afetar o resultado final para enumeração de bactérias, bem

como determinar o tempo mínimo de incubação necessário para a obtenção de valores de contagem confiáveis para cada um dos micro-organismos utilizados no estudo.

Os resultados das recuperações de fluorescência e viabilidade foram calculados com os valores das contagens obtidas nos ensaios realizados na etapa 1, após transformação logarítmica. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

O tempo mínimo de incubação para detecção por fluorescência foi obtido após 36 h de incubação para os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* e após 40 h para os micro-organismos *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, tempos a partir dos quais foram obtidos valores de recuperação superiores a 90,0% para as contagens através de fluorescência.

O teste ANOVA foi utilizado para avaliar a existência de diferenças estatísticas entre os resultados obtidos em cada um dos períodos de incubação propostos pelo método alternativo e pelo método tradicional. A obtenção de p-valor igual ou superior a 0,05 não rejeita a hipótese nula (H_0), permitindo assumir que as contagens obtidas nos tempos de incubação avaliados não apresentam diferenças estatísticas para um intervalo de confiança de 95%.

Para as contagens obtidas por fluorescência para os micro-organismos *E. coli*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa*, o teste ANOVA indicou resultados superiores a 0,05 para os valores de p relacionados a cada micro-organismo, indicando que não havia diferença significativa entre os valores de recuperação dos tempos de incubação avaliados (Tabela 1).

Entretanto, para o micro-organismo *S. aureus*, o teste ANOVA calculou um p-valor igual a 0,02 para as contagens obtidas por fluorescência, indicando que havia diferença significativa entre os valores de recuperação dos tempos de incubação avaliados. Após aplicação dos testes de Tukey e de Fischer, foi verificado que o tempo que apresentou diferença estatística foi o de 36 h.

Para as contagens de viabilidade, foram obtidos valores de recuperação superiores a 90,0% para todos os micro-organismos em estudo, nas contagens de fluorescência nos tempos de incubação de 24, 36, 40, 48 e 120 h, com p-valor superior a 0,05 após aplicação do teste ANOVA. Com estes dados, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os valores de recuperação de viabilidade para os micro-organismos em estudo (Tabela 1).

Portanto, o método Milliflex® Quantum demonstrou ser robusto no range de 36 h a 120 h de incubação para o micro-organismo *E. coli* e no range de 40 h a 120 h para os micro-organismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*.

De forma a contemplar o tempo mínimo de incubação comum a todos os micro-organismos em estudo, foi selecionado o tempo de incubação de 40 h para a condução da avaliação de desempenho do método alternativo através do sistema Milliflex® Quantum na etapa 2.



Tabela 1. Resultados da recuperação de fluorescência e viabilidade por meio do sistema Milliflex® Quantum.

Micro-organismo	Recuperação de fluorescência ± DP (%)					ANOVA p-valor
	24 h	36 h	40 h	48 h	120 h	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND	96,3 ± 2,7	97,8 ± 2,4	99,4 ± 2,1	0,42
<i>Burkholderia cepacia</i>	ND	ND	96,6 ± 3,4	101,0 ± 1,3	100,0 ± 0,8	0,30
<i>Escherichia coli</i>	ND	95,2 ± 2,5	99,7 ± 1,9	97,0 ± 4,1	95,1 ± 5,3	0,73
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	90,7 ± 1,1	100,0 ± 2,3	100,1 ± 0,9	98,3 ± 2,6	0,02

Micro-organismo	Recuperação de viabilidade ± DP (%)					ANOVA p-valor
	24 h*	36 h*	40 h*	48 h*	120 h*	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,3 ± 1,5	98,8 ± 2,7	96,5 ± 2,8	98,7 ± 2,3	99,9 ± 1,7	0,60
<i>Burkholderia cepacia</i>	97,5 ± 2,7	99,3 ± 2,6	96,9 ± 4,1	101,0 ± 1,0	99,5 ± 1,8	0,46
<i>Escherichia coli</i>	96,7 ± 1,6	98,8 ± 5,2	99,5 ± 0,6	96,6 ± 4,4	96,4 ± 5,1	0,43
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,2 ± 2,1	99,9 ± 4,4	101,0 ± 3,4	99,9 ± 2,4	98,6 ± 2,7	0,82

Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

ND: não detectado; DP: desvio-padrão.

* referente ao tempo de incubação utilizado para detecção por fluorescência

Etapa 2 - Avaliação de Desempenho

Os resultados de contagem obtidos por meio do método tradicional foram utilizados como valores esperados para o inóculo padrão, em seus respectivos níveis de concentração.

Para avaliar a exatidão do método alternativo, os resultados das recuperações de fluorescência e viabilidade foram calculados utilizando o logaritmo dos valores das contagens obtidas nos ensaios realizados na etapa 2.

Os valores de recuperação de fluorescência e viabilidade foram superiores a 90,0% para os níveis de concentração entre 5 e 100 UFC/placa para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa* com valor de desvio-padrão máximo de 24,5% para a recuperação de fluorescência com o inóculo de 5 UFC/placa referente ao micro-organismo *S. aureus*.

Não foi obtido crescimento microbiano para os inóculos com concentração alvo de 0,25 e 0,5 UFC/placa por meio dos métodos alternativo e tradicional para os micro-organismos *B. cepacia*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Para os inóculos com concentração-alvo de 1 UFC/placa de todos os micro-organismos em estudo, bem como para o inóculo com concentração alvo de 0,5 UFC/placa de *S. aureus*, não foi obtido crescimento microbiano em todas as réplicas ensaiadas pelos métodos alternativo e tradicional.

Desta forma, como algumas réplicas apresentaram o valor médio de contagem igual a um ou zero, após transformação logarítmica, estes dados resultam em valores iguais a zero, impossibilitando o cálculo do valor médio de recuperação de fluorescência e de viabilidade para o método alternativo para os inóculos com concentração alvo de 0,5 UFC/placa e 1 UFC/placa.

Foi realizada, adicionalmente, a aplicação do teste de Levene para avaliação da homogeneidade de variância por faixa de

concentração para cada micro-organismo, para o intervalo de confiança de 95%. Foram obtidos resultados de p-valor superiores a 0,05 para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, indicando que os erros apresentam variância homogênea, um pressuposto para a aplicação do teste ANOVA.

Em seguida, foi empregado o teste ANOVA com um fator, para o intervalo de confiança de 95%, com o objetivo de determinar se o logaritmo das contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo após 40 h e 120 h de incubação, respectivamente, não era estatisticamente diferente do logaritmo das contagens obtidas pelo método tradicional após 120 h de incubação.

A obtenção de p-valor igual ou superior a 0,05 não rejeita a hipótese nula (H0), permitindo assumir que o logaritmo das contagens obtidas pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional não apresentam diferenças estatísticas para um intervalo de confiança de 95%.

O teste ANOVA com um fator indicou resultados superiores a 0,05 para os valores de p relacionados a cada nível de concentração de cada micro-organismo, sugerindo que não há diferença estatística entre o logaritmo das contagens por fluorescência e viabilidade obtido pelo método alternativo bem como pelo método tradicional para a faixa de 5 a 100 UFC/placa para todos os micro-organismos em estudo.

Para avaliar a precisão, foram calculados os coeficientes de variação (CV) para o logaritmo das contagens por fluorescência, viabilidade e para o logaritmo das contagens obtidas pelo método tradicional para todos os micro-organismos, em cada nível de concentração.

De acordo com *Parenteral Drug Association*¹⁷, são aceitos coeficientes de variação inferiores a 35,0% para métodos tradicionais de contagem em placa para contagens superiores a 10 UFC/placa. O atendimento a este critério pelo método alternativo isenta a



necessidade de comparação entre o coeficiente de variação do método alternativo com o coeficiente de variação do método tradicional¹⁷. A Farmacopeia Brasileira¹⁹ estabelece que valores inferiores a 30,0% para o coeficiente de variação demonstram uma precisão aceitável para os métodos.

Conforme esperado, os maiores valores de coeficiente de variação foram obtidos para as contagens realizadas com os inóculos com concentração alvo de 5 UFC/placa, para os quatro micro-organismos em estudo, como demonstrado na Tabela 2. Para os inóculos de 10, 25, 50 e 100 UFC/placa, os CV obtidos também se encontram em conformidade com os critérios de aceitação normativos.

Para os estudos de precisão intermediária, foram avaliados os CV calculados com o logaritmo das contagens por fluorescência, viabilidade e pelo método tradicional para todos os micro-organismos, em cada nível de concentração.

Para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa*, os maiores valores de coeficiente de variação foram obtidos para o logaritmo das contagens referentes ao inóculo de 10 UFC/mL (Tabela 2), com exceção do coeficiente de variação calculado com as contagens de viabilidade para o inóculo de 25 UFC/placa de *B. cepacia*, o qual apresentou um valor de 2,7%, superior ao de 10 UFC/placa (1,6%). Todas as contagens obtidas com os inóculos de concentração entre 10 e 100 UFC/placa apresentaram CV inferior a 30,0%.

Com o objetivo de avaliar se a variabilidade das medições poderia ser explicada pela diferença de analistas, foi realizado o estudo de medição de repetibilidade e reprodutibilidade (R&R). Para a condução do teste foram utilizados os valores logarítmicos das contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo bem como das contagens visuais obtidas pelo método tradicional, pelos analistas A e B.

A avaliação da homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene entre os grupos de contagem de fluorescência,

viabilidade e método tradicional para cada micro-organismo, com intervalo de confiança de 95%, demonstrou que os dados apresentam homogeneidade de variâncias (p-valor superior a 0,05), um pressuposto para a aplicação do teste ANOVA, contemplado no estudo R&R.

As tabelas ANOVA dos estudos R&R indicaram resultados superiores a 0,05 para os valores de p relacionados a cada micro-organismo, indicando que a interação entre dia e analista não foi significativa ao nível de significância de 5% para as contagens obtidas pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional (dados não mostrados).

As tabelas de avaliação das medições dos estudos R&R para os quatro micro-organismos em estudo apresentaram valores compreendidos entre 3,7% e 7,4% para a porcentagem de variação do estudo e valor mínimo de 19 para o número de categorias distintas (*S. aureus*), ambos parâmetros em conformidade com os critérios de aceitação definidos: coeficiente de variação do estudo inferior a 30,0% e número de categorias distintas superiores a 5.

A amplitude amostral obtida pelos analistas A e B para cada micro-organismo avaliado, por nível de concentração e metodologia empregada, é demonstrada pelas cartas controle R por meio da Figura 1.

Como pode ser observado na Figura 1, todos os pontos se encontram dentro dos limites da carta de controle da amplitude amostral, demonstrando que as medições entre analistas são consistentes.

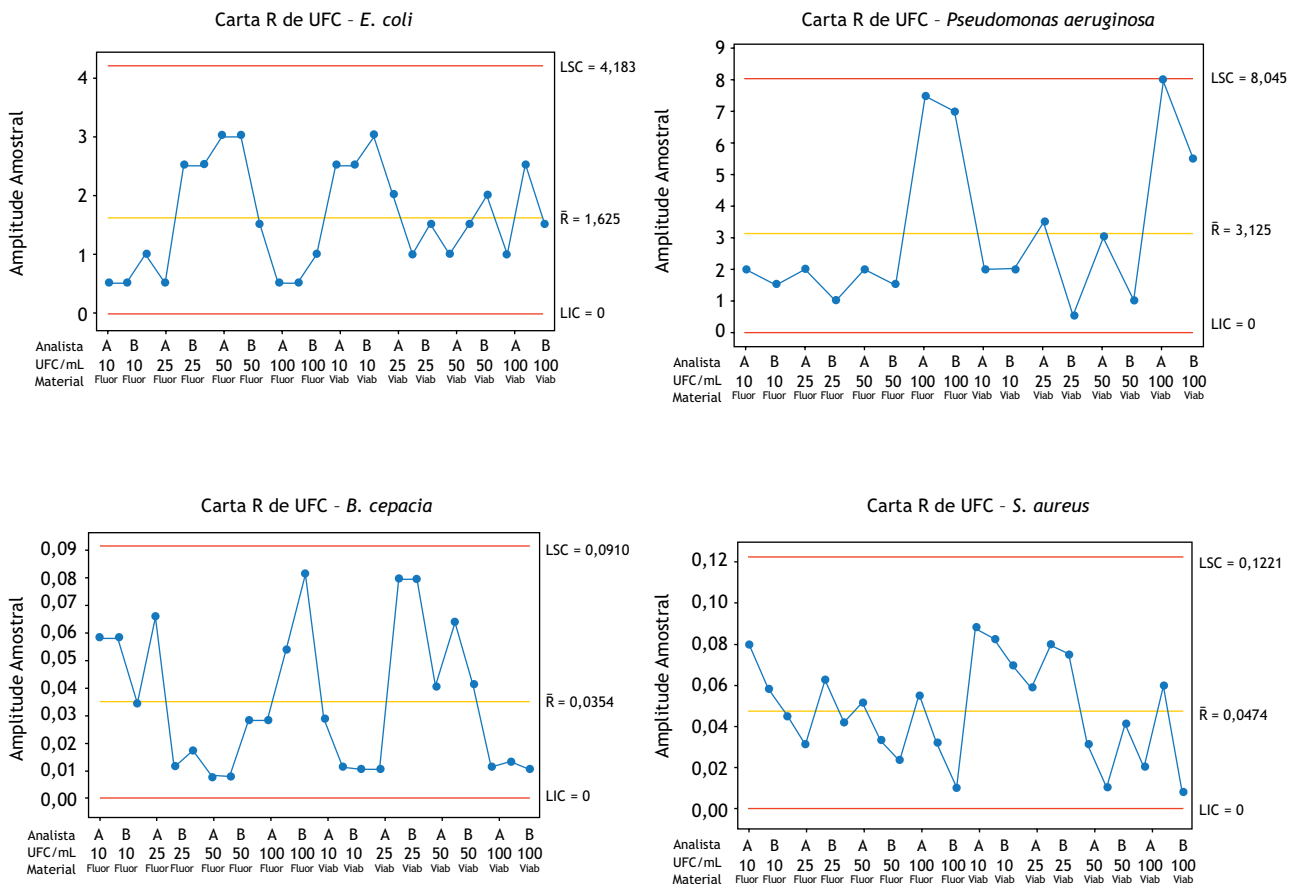
Para o estudo de linearidade com os micro-organismos em estudo, o teste de correlação de Pearson indicou forte correlação (valores superiores a 0,95) entre as contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo frente às contagens obtidas pelo método tradicional. A obtenção de p-valor inferior a 0,05 para ambas correlações permite rejeitar a hipótese de que o coeficiente de correlação é igual a zero, indicando que existe uma relação significativa entre as variáveis testadas.

Tabela 2. Coeficientes de variação referentes aos ensaios de precisão (n = 7) e precisão intermediária (n = 6) para os inóculos de 5 UFC/placa e 10 UFC/placa, respectivamente.

Micro-organismo	Coeficiente de variação (%) - Precisão		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
<i>S. aureus</i>	19,8	21,1	28,7
<i>E. coli</i>	14,7	13,4	14,8
<i>B. cepacia</i>	11,2	13,7	11,8
<i>P. aeruginosa</i>	8,9	8,2	9,2

Micro-organismo	Coeficiente de variação (%) - Precisão intermediária		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
<i>S. aureus</i>	4,3	3,8	4,3
<i>E. coli</i>	6,2	4,5	5,4
<i>B. cepacia</i>	3,4	1,6	3,9
<i>P. aeruginosa</i>	3,8	4,4	5,7

Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

Figura 1. Carta R do estudo de repetibilidade e reprodutibilidade para os micro-organismos em estudo.

Para as análises de regressão linear individuais para cada micro-organismo em estudo, foi utilizada a média dos logaritmos das contagens obtidas pelas sete réplicas por nível de concentração pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional. Para as análises de regressão linear contemplando o conjunto dos dados dos quatro micro-organismos, foi utilizada a média dos logaritmos das contagens obtidas pelas sete réplicas por nível de concentração pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional de cada micro-organismo.

A análise de regressão demonstrou correlação linear entre as contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo frente as contagens obtidas pelo método tradicional para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, para todos os micro-organismos em estudo, como pode ser observado na Figura 2.

Os gráficos de resíduos obtidos nas análises de regressão linear individuais para cada micro-organismo, bem como nas que contemplaram o conjunto de dados dos quatro micro-organismos-alvo, foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos padronizados, à variância e à independência dos resíduos.

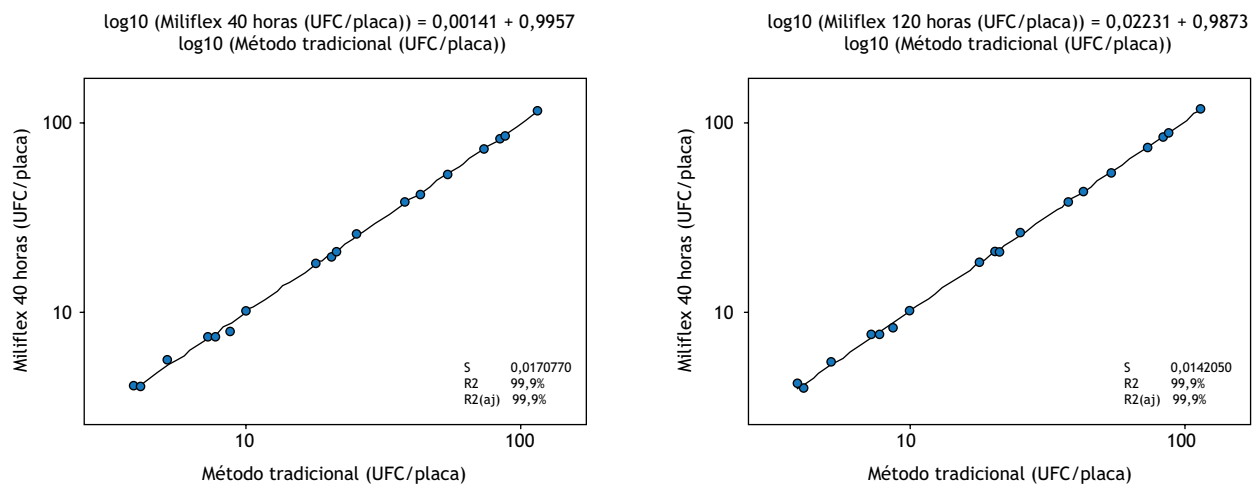
A presunção de normalidade da distribuição dos resíduos foi confirmada pela obtenção de p-valor superior a 0,05 para a faixa

entre 5 UFC/placa e 100 UFC/placa, para cada micro-organismo, através do teste de normalidade e do gráfico de probabilidade normal dos resíduos. Com estes valores, a hipótese alternativa pode ser rejeitada, permitindo assumir que a distribuição dos resíduos é normal.

O gráfico de resíduos versus ajustes (Figura 3) permitiu verificar a pressuposição de que os resíduos são aleatoriamente distribuídos e apresentam variância constante. Esta hipótese foi confirmada após aplicação do teste Levene para avaliação da igualdade de variâncias, por faixa de concentração, no qual foram obtidos resultados de p-valor superiores a 0,05 para a faixa de 5 a 100 UFC/placa. Com estes valores, a hipótese alternativa pode ser rejeitada, permitindo assumir que os erros resíduos são homocedásticos.

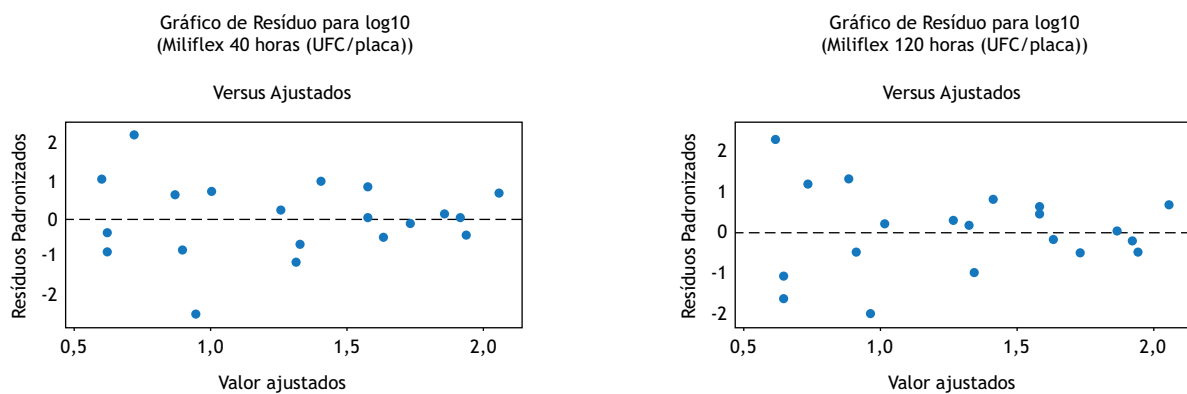
A independência dos resíduos foi observada por meio do gráfico de resíduos versus ordem gerado pelo software Minitab.

Portanto, ao realizar a análise de regressão linear dos dados obtidos no range de 5 a 100 UFC/placa para os quatro micro-organismos desafiados, foi possível avaliar a existência de correlação entre as contagens de fluorescência (método alternativo) e as contagens visuais (método tradicional), bem como entre as contagens de viabilidade (método alternativo) e as contagens visuais (método tradicional).



Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

Figura 2. Análise de regressão linear contemplando *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*: fluorescência x método tradicional; viabilidade x método tradicional.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

Figura 3. Gráfico de resíduos versus ajustes contemplando *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*: fluorescência x método tradicional; viabilidade x método tradicional.

A especificidade do método alternativo foi evidenciada pela detecção positiva das bactérias Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa*) desafiadas para o range de 5 a 100 UFC/placa.

Para os ensaios de limite de detecção e de quantificação, não foi observado crescimento microbiano nas placas inoculadas com suspensões bacterianas com concentração alvo de 0,25 e 0,5 UFC/placa por meio dos métodos alternativo e tradicional para os micro-organismos *B. cepacia*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Para os micro-organismos *E. coli*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa*, foi possível observar crescimento microbiano em pelo menos 50,0% das placas inoculadas com suspensão na concentração alvo de 1 UFC/placa por meio dos métodos alternativo e tradicional, enquanto para o micro-organismo *S. aureus* esta observação foi realizada a partir da suspensão com concentração alvo de 5 UFC/placa.

Portanto, para o parâmetro limite de detecção, a faixa de concentração em que foi observado crescimento microbiano em 50,0% das amostras pelo método tradicional para todos os micro-organismos desafiados foi a de 5 UFC/placa, com detecção positiva em todas as réplicas. O mesmo comportamento foi verificado no método alternativo para as contagens de fluorescência e viabilidade. Para esta faixa, o teste T de Student não identificou diferenças estatísticas entre as contagens por fluorescência (método alternativo) versus contagens visuais pelo método tradicional bem como entre as contagens de viabilidade (método alternativo) versus contagens visuais pelo método tradicional (p-valor superior a 0,05), para os quatro micro-organismos em estudo.

Para o parâmetro limite de quantificação, a menor concentração testada que atendeu aos critérios de precisão, exatidão e linearidade para todos os micro-organismos avaliados para o método alternativo foi a de 5 UFC/placa. Portanto, foi estabelecido o limite de quantificação de 5 UFC/placa para o método alternativo.



Para a determinação da robustez do método alternativo foi avaliado o parâmetro tempo de incubação da amostra. Foram utilizados os ensaios da etapa 1 para avaliação dos resultados.

Etapa 3 - Equivalência

Os estudos de equivalência são empregados para demonstração da ausência de diferenças entre os resultados obtidos por dois métodos analíticos enquanto os estudos de não inferioridade possuem o objetivo de demonstrar que um novo método analítico não é, dentro de certos critérios, menos sensível, exato e preciso a um método analítico já existente. Deste modo, a formulação das hipóteses a serem testadas é o que caracteriza a diferença entre os dois tipos de estudos.

Na avaliação de desempenho do método alternativo, a não inferioridade do método alternativo em relação ao método tradicional necessita ser comprovada^{19,20}.

Para este propósito foi aplicado o TOST para amostras pareadas com o logaritmo das contagens obtidas nos ensaios realizados na etapa 2, bem como para o logaritmo das contagens obtidas nos ensaios realizados com as amostras de água tratada para hemodiálise descritos na etapa 3.

Com relação aos dados obtidos nos ensaios realizados com as 24 amostras de água tratada para hemodiálise na etapa 3, foram excluídos da análise estatística nesta etapa os resultados das amostras que apresentaram contagem de bactérias heterotróficas igual a zero ($n = 9$) devido à impossibilidade de se realizar uma comparação estatística para equivalência entre o método alternativo e o método tradicional, se ambos os métodos reportarem ausência de crescimento microbiano. Uma amostra teve os resultados também excluídos da análise estatística nesta etapa devido à impossibilidade de quantificação, pois as contagens obtidas nas placas da diluição 10^{-1} apresentaram contagens superiores a 100 UFC/placa, resultando em valores superiores a 1.000 UFC/mL para esta amostra. Desta forma, as análises estatísticas contemplaram a avaliação de 14 amostras ($n = 14$).

A hipótese nula de que o método alternativo não é inferior ao método tradicional foi testada usando um limite inferior de 70,0%.

Rejeitar a hipótese nula significa que a diferença entre o resultado numérico da metodologia tradicionalmente empregada e o de uma metodologia alternativa é menor que uma margem de tolerância e, portanto, o método alternativo não é inferior ao método tradicional. O método alternativo é considerado não inferior se o limite inferior do intervalo de confiança de 95% da diferença entre método tradicional e alternativo não incluir o valor da margem especificada. Desta forma, um p-valor inferior a 0,05 como resultado do teste permite rejeitar a hipótese nula e provar a não inferioridade do método alternativo frente ao método tradicional, para um intervalo de confiança de 95%.

Para todos os micro-organismos testados na etapa 2 bem como para as amostras de água para hemodiálise avaliadas na etapa 3, os valores de contagem obtidos estão compreendidos dentro nos limites de não inferioridade, demonstrando a não

inferioridade do método alternativo frente ao método tradicional (dados não mostrados).

O teste de equivalência com dados pareados pode ser utilizado para testar se a média de um conjunto de dados teste é equivalente à média de um conjunto de dados de referência quando as observações forem realizadas concomitantemente, sendo a equivalência para o teste definida por um intervalo de valores especificado denominado intervalo de equivalência. O resultado determinará se as provas são suficientes para afirmar que a razão entre as médias dos conjuntos de dados está compreendida dentro do intervalo de equivalência.

A hipótese de que os métodos alternativo e tradicional são equivalentes foi testada com os dados obtidos na etapa 2 para os quatro micro-organismos em estudo, bem como com os dados obtidos nos ensaios das amostras de água tratada para hemodiálise na etapa 3, utilizando um limite inferior de 70,0% e um limite superior de 130%.

A obtenção de p-valor inferior a α (0,05) permite rejeitar a hipótese nula e concluir que a diferença entre as médias está compreendida no intervalo de equivalência, sendo as médias, portanto, equivalentes.

De acordo com o observado na Figura 4, é possível afirmar que o método alternativo, para um período mínimo de incubação de 40 h, possui resultados equivalentes ao método tradicional, uma vez que o intervalo de confiança do método alternativo encontra-se inteiramente compreendido dentro do intervalo de equivalência em ambos os gráficos.

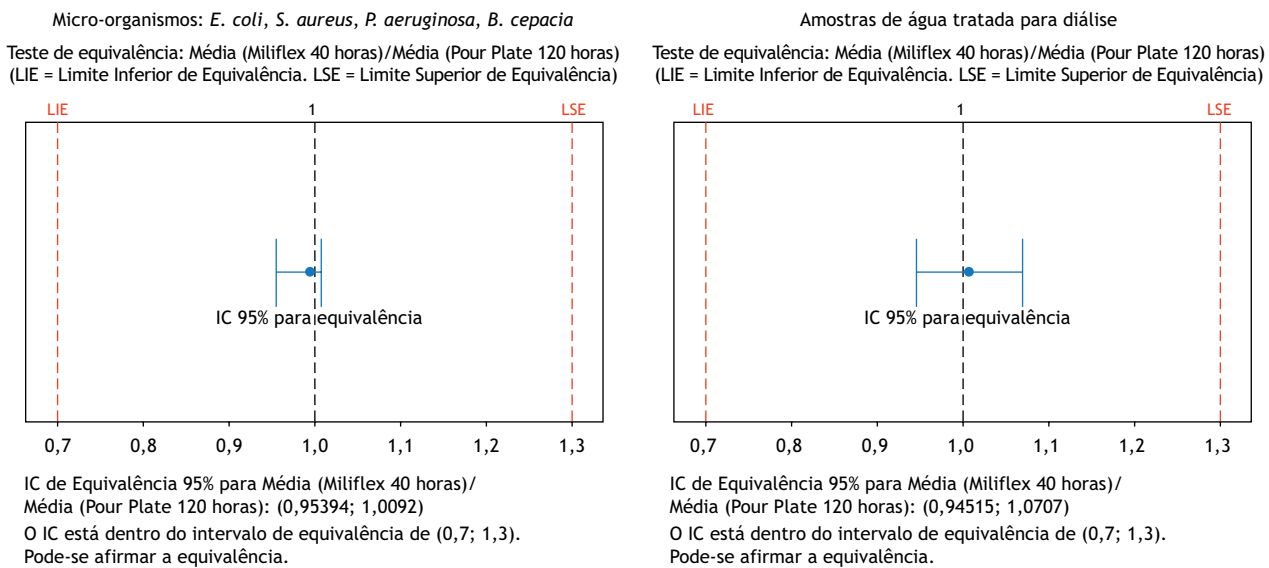
CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o método alternativo apresenta resultados equivalentes ao método tradicional, permitindo a quantificação de bactérias heterotróficas após 40 h de incubação com exatidão, precisão, especificidade e linearidade para o range de 5 a 100 UFC/placa, resultando em uma redução de aproximadamente 67,0% do tempo atualmente empregado no método tradicional.

Portanto, a partir destes resultados é possível concluir que a metodologia alternativa se apresentou linear e específica para a enumeração de *S. aureus*, *E. coli*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa*, uma vez que foi possível a detecção positiva de todos os micro-organismos-alvo, bem como foram obtidos coeficientes de correlação superiores a 0,95 e retas com inclinação entre 0,8-1,2.

Com base nas avaliações estatísticas apresentadas, é possível concluir que os efeitos dos fatores dia e analista não foram significativos para o estudo de precisão intermediária para todos os micro-organismos em estudo.

A metodologia alternativa demonstrou-se precisa para todos os micro-organismos em estudo, visto que os valores de coeficiente de variação obtidos são inferiores a 30,0%, o critério mais restritivo, para a faixa de 5 a 100 UFC/placa.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2019.

Figura 4. Teste de equivalência entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional nas etapas 2 e 3, contemplando os micro-organismos e as amostras de água tratada para hemodiálise.

O método alternativo demonstrou ser robusto para o período entre 40 h e 120 h de incubação por meio do sistema Milliflex® Quantum para todos os micro-organismos em estudo.

Além disso, é possível afirmar que o método alternativo, para um período mínimo de incubação de 40 h, possui resultados equivalentes ao método tradicional, uma vez que o intervalo de confiança do método alternativo encontra-se inteiramente compreendido dentro do intervalo de equivalência.

Portanto, a técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência caracteriza uma opção viável para a implementação de um método microbiológico rápido para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise.

A importância da implementação de métodos microbiológicos rápidos para o monitoramento da qualidade microbiológica da água tratada para hemodiálise constitui importante ferramenta para os laboratórios de saúde pública, de forma a auxiliar que os pacientes renais crônicos que utilizam os serviços de hemodiálise sejam expostos a baixos riscos.

Com os resultados obtidos por meio do uso do método alternativo neste estudo, recomenda-se o uso desta metodologia como incremento da capacidade de resposta analítica dos laboratórios prestadores de serviços públicos e privados responsáveis pelo controle de qualidade de água tratada para hemodiálise no sentido de aperfeiçoar as ações sanitárias e regulatórias nos serviços de saúde.

REFERÊNCIAS

1. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Junior JE. Revisão/atualização em diálise: água para hemodiálise. *J Bras Nefrol.* 1996;18(2):180-8.
2. Roth VR, Jarvis WR. Outbreaks of infection and/or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial.* 2000;13(2):92-6. <https://doi.org/10.1046/j.1525-139x.2000.00027.x>
3. Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and water quality. *Semin Dial.* 2013;26(4):427-38v. <https://doi.org/10.1111/sdi.12113>
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de diálise e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 14 mar 2014.
5. The United States Pharmacopeial Convention - USP. US pharmacopeia. 42a ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2019.
6. Ferreira JAB, Nobrega HN, Vieira VV, Abrantes SMP. Diversidade genética e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva. *Analytica.* 2013;11(65):56-70.
7. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 2010;27(6):710-30. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>
8. American Public Health Association - APHA. Standard methods for examination of water and wastewater. 23a ed. Baltimore: American Public Health Association; 2017.
9. Lonnemann GL. Assessment of the quality of dialysate. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(5):17-20. https://doi.org/10.1093/ndt/13.suppl_5.17



10. Reasoner DJ. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *Int J Food Microbiol.* 2004;92(3):307-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.008>
11. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49(1):1-7.
12. Sandle T. Assessment of the suitability of R3A agar for the subculture of microorganisms isolated from pharmaceutical water systems. *Eur J Parenteral Phar Sciences.* 2014;19(3):85-93.
13. Bugno A, Almodovar AAB, Pereira TC. Enumeration of heterotrophic bacteria in water for dialysis: comparison of the efficiency of reasoner' 2 agar and plate count agar. *Braz J Microbiol.* 2010;41(1):15-8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100003>
14. Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto AF. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 4a ed. São Paulo: Manole; 2015.
15. Sutton S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. *Pharm Tech.* 2005;29(4):118-22.
16. Canaud B. Rapid assessment of microbiological purity of dialysis water: the promise of solid-phase cytometry assessment and epifluorescence microscopy method. *Nephrol Dial Trans.* 2010;26(11):3426-28. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr601>
17. Parenteral Drug Association - PDA . Technical report N° 33: Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods (revised). Bethesda: Parenteral Drug Association; 2013.
18. Miller MJ. Encyclopedia of rapid microbiological methods. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2005.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia brasileira. 5a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2016[acesso 20 jun 2019]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>
20. Council of Europe - CE. European pharmacopoeia. 9a ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017.
21. Baumstumm A, Chollert R, Meder H, Rofel C, Venchiarutti A, Ribault S. Detection of microbial contaminants in mammalian cell cultures using a new fluorescence-based staining method. *Lett Appl Microbiol.* 2010;51(6):671-77. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02952.x>
22. Meder H, Baumstumm A, Chollert R, Barrier S, Kukuczka M, Olivieri F et al. Fluorescence-based rapid detection of microbiological contaminants in water samples. *Scientific World J.* 2012;1-10. <https://doi.org/10.1100/2012/234858>
23. Miller MJ. Encyclopedia of rapid microbiological methods. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2005.
24. Bugno A, Almodovar AAB, Silva FFL, Hilinski EG, Buzzo ML. Qualificação do transporte de amostras para o monitoramento da qualidade de água tratada para uso em diálise. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2018;(77):1-9.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro destinado ao projeto.

Contribuição dos Autores

Hilinski EG, Bugno A - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Silva FPL, Almodovar AAB, Pinto, TJA - Análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.